

花生 DNA 导入大豆后代蛋白组分 及氨基酸的变异性*

许守民 苗以农 常今花 索塔林

(东北师范大学生物系, 长春 130024)

王丕武 张晓玲 刘宗昭 张军

(吉林农业大学农学系, 长春 136081)

摘 要

花生 DNA 导入大豆后, 子代种子的蛋白质含量明显高出双亲, 表现出杂种优势。对萌发各期子叶蛋白的电泳分析表明, 导入后代的绝大部分蛋白亚基组分与大豆相似, 但分子量近 30KD 的一条蛋白带与花生的相似, β 亚基的变化也与大豆的有差异。导入后代的甘氨酸、亮氨酸、组氨酸和苏氨酸含量明显高于两亲本, 而谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、色氨酸低于亲本; 其它氨基酸含量接近两亲本之一或居中, 其中丝氨酸、异亮氨酸含量与花生的相似。结果表明: 花生 DNA 导入大豆后, 引起了后代在蛋白质和氨基酸方面的明显变异。

关键词 花生; DNA; 大豆; 蛋白质; 氨基酸

DNA 导入技术早在 70 年代就由我国的周光宇先生首创, 并用在了棉花、高粱等远缘育种上, 取得了良好效果^[3,4,7]。近年来, 此项技术广泛应用到许多作物上^[1,2,5,6]。并不断有人证明 DNA 导入技术的可靠性^[3,7,8,9]。80 年代后期, 先后有人在野生大豆 DNA 导入栽培大豆^[2,6]、花生 DNA 导入大豆^[1,5]上取得成功。我们在 1989 年用花生 DNA 导入大豆后, 在后代中筛选出一个蛋白质含量高、产量性状较好的品系。对此, 我们进行了亲本及后代蛋白含量、贮藏蛋白组分及氨基酸组分的分析, 借以探讨导入后代与亲本之间的遗传关系。

* 本文于 1993 年 10 月 5 日收到。

This paper was received on Oct. 5, 1993.

材料和方法

(一)材料

大豆(*Glycine max* (L.) Merr)种子为兴农 4 号,花生(*Arachis hypogaea*)种子为吉引 1 号,花生导入大豆的后代种子为 D₃ 代种子。其导入方法及 D₃ 代表型见文献^[1]。

(二)方法

1. 种子蛋白质含量的分析 用半微量凯氏定氮仪测定

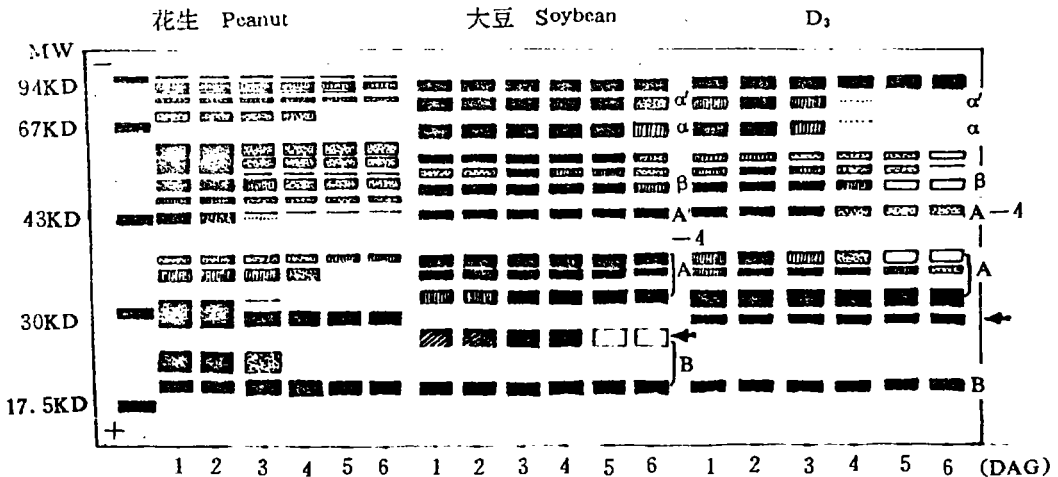


图 1 萌发过程中花生、大豆和花生 DNA 导入后代 D₃ 子叶贮藏蛋白组分的分离及变化

Fig. 1 The separation and changes of storage protein subunits in peanut, Changnong 4 and their DNA transfer offspring D₃ during germination (DGA) Days after germination

2. 种子氨基酸组分分析 取 0.5g 种子干粉用盐酸在 110℃ 水解 24 小时、NaOH 中和后于岛津 CS-5000 型高压液相色谱仪上进行层析定量。

3. 种子贮藏蛋白亚基的分析 将三个样品的种子于 25℃ 下萌发,取萌发 1-6 天的种子子叶,用提取液(65mmol/L 磷酸缓冲液 pH7.6, 0.4mol/L NaCl, 0.01mol/L β-巯基乙醇)在 4℃ 下研磨提取一昼夜,12.000×g 离心 20 分钟,取上清液做分离样品。蛋白电泳采用 Suninili 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶系统,浓缩胶 4%,分离胶浓度为 12%。稳流 25mA 电泳 8.5 小时,考马斯亮兰 R250 染色,甲醇-冰醋酸脱色。

结果与分析

(一)蛋白质含量

测定表明,花生、大豆和 D₃ 种子的蛋白质含量分别为 29.95%、44.99%和 50.70%, D₃ 的蛋白质含量比花生和大豆分别高出 69.23%和 12.69%。表现出明显的变异并表现

出杂种优势。

(二)种子氨基酸组成的分析

3 个材料 18 种氨基酸的分析结果列于表 1。

表 1 花生,长农 4 号及 DNA 导入后代 D₃ 子叶中氨基酸的组成

Table 1 The amino acids components in peanut, Changnong 4 and their offspring D₃ (mg/100g)

氨基酸 Amino acids	D ₃	Changnong 4	花生 Peanut
天冬氨酸 Asp	154.81	480.01	307.15
谷氨酸 Glu	761.13	1673.38	1142.59
丝氨酸 Ser	219.07	175.60	205.04
甘氨酸 Gly	1456.03	354.47	793.83
苏氨酸 Thr	309.45	119.73	108.72
脯氨酸 Pro	317.93	480.39	219.66
丙氨酸 Ala	163.33	495.19	597.22
精氨酸 Arg	1150.19	1128.34	998.50
缬氨酸 Val	355.19	2143.94	1080.66
蛋氨酸 Met	217.66	325.07	298.47
胱氨酸 Cys	352.74	374.69	144.07
异亮氨酸 Ile	1410.19	931.38	1429.34
亮氨酸 Leu	1934.17	1657.51	667.46
色氨酸 Trp	576.83	1056.07	975.24
苯丙氨酸 Phe	1073.29	1331.47	615.24
组氨酸 His	1119.26	556.74	315.94
赖氨酸 Lys	242.88	451.68	141.31
酪氨酸 Tyr	429.44	137.20	1020.69

从表中可以看出, D₃ 的组、亮、苏和甘氨酸含量高于双亲;天、谷、丙、缬、蛋和色氨酸含量则低于两亲本;酪、赖、苯丙和脯氨酸含量介于两亲之间;而异亮氨酸,丝氨酸含量与花生的相似;胱氨酸、精氨酸含量与大豆的相似。从氨基酸总量看, D₃ 为 13.322g/100g, 大豆为 12.873g/100g, 花生为 11.061g/100g, 也是以 D₃ 的为最高。

(三)种子萌发过程中种子贮藏蛋白组分的变化

电泳分析表明,大豆和花生的贮藏蛋白亚基的数目和电泳谱带的分布大多数是相似的,但花生中分子量较高的蛋白亚基(α' , α)含量要比大豆的少得多;分子量在 44KD 和 56KD 之间的 4 个蛋白带其电泳迁移率虽与大豆的 4 条带在相同范围内,但萌发中降解的较快,有的含量较少,分子量为 56KD 和 38KD 的两个蛋白带又明显比大豆的含量少。另外,分子量较小的蛋白亚基(约 30000D)是大豆所没有的,而大豆中的 25KD 蛋白是花生和 D₃ 所没有的。从整体上看,花生的大多数蛋白随萌发而降解或消失,而大豆的只有少数几个蛋白亚基在萌发的 6 天里产生降解(如 α' , α , β)。

D₃ 的蛋白亚基的分子量分布、组成与大豆的接近,但有两点与花生有相似之处:1)有许多亚基随萌发而降解(见图 1);2)分子量 30000 的蛋白亚基与花生中的相似,而分子量为 25000 的大豆蛋白亚基在 D₃ 中却没有。从以上结果看,花生蛋白的亚基成分基因进入了大豆中。

讨 论

我们曾报道花生 DNA 导入大豆其后代在植株形态、叶片大小、结荚习性、种皮颜色及产量性状等方面均出现变异^[1]。这从农学角度很明显地看出 DNA 导入技术对引起后代变异的真实与可靠性。本文从蛋白质、贮藏蛋白的亚基成分及氨基酸组成方面提供了花生 DNA 导入大豆引起后代变异的分子证据。

本结果表明,DNA 导入后代的蛋白质含量明显地高于双亲,氨基酸总量、组氨酸、亮氨酸、苏氨酸及甘氨酸含量也高于双亲,这说明 DNA 导入引起的后代变异,同样可以导致杂种优势的出现。

与常规杂交相比,DNA 导入是供体的部分 DNA 片段与受体基因的杂交^[3,9],后代的变异个体在多数性状上与受体相似。从我们的结果也看出,除了分子量为 30000 左右的蛋白亚基与花生的相似外,D₃ 的多数贮藏蛋白亚基与受体长农 4 号的相似(图 1)。然而。虽然 β -亚基的几个亚基谱带与长农 4 号相似,但仍在含量(着色深度)及萌发中的变化上与长农 4 号不同,这表明,供体 DNA 控制的基因不但可以进入受体而表达,而且还会以某种方式或途径影响受体的基因表达而改变后代性状。

参考文献

- [1] 王丕武,许守民等,1992,花生 DNA 导入栽培大豆的研究初报,吉林农业大学学报,14(3):1-3
- [2] 刘德璞,袁鹰,庄炳昌,1991,外源 DNA 导入大豆变异后代的 SOD 同工酶谱分析,大豆科学,10(3):194-198
- [3] 周光宇,黄峻麒,陈善葆等,1988,农业分子育种,中国农业科学,21(3):1-6
- [4] 段晓岚,陈善葆,1985,外源 DNA 导入水稻引起的性状变异,中国农业科学,3:6-10
- [5] 赵经荣,战明奎,黄承参,颜庭进,1990,花生 DNA 导入大豆引起性状变异简报,大豆科学,9(1):76
- [6] 雷勃钧,尹光初,卢翠华,钱华,张开旺,周兴,王树林,1991,外源 DNA 直接导入大豆的研究,大豆科学,10(1):58-62
- [7] 翁坚,黄峻麒,沈慰芳等,1984,外源 DNA 导入棉花的分子验证,生物化学与生物物理学报,16(3):325-326
- [8] 龚蓁蓁,沈慰芳,周光宇等,1988,受粉后外源 DNA 导入植物技术,中国科学 B 辑,6:611-614
- [9] 周光宇,1978,从生物化学角度探讨远缘杂交的理论,中国农业科学,2:16-20
- [10] Sun, S. M., B. U. Huchbinder and T. C. Hall, 1975, Cell-free Synthesis of the major storage protein of the Bean, *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol 56:780-785

VARIABILITY OF THE PROTEIN AND AMINO ACIDS BETWEEN PEANUT, SOYBEAN AND THEIR OFFSPRING FROM DNA INTRODUCING

Xu Shoumin Miao Yinong Chang Jinhua Shou Talin

(*Department of Biology, Northeast Normal University, Changchun 130024*)

Wang Peiwu Zhang Xiaoling Liu Zhongzhao Zhang Jun

(*Department of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118*)

Abstract

Exogenous peanut (*Arachis hypogaea*) DNA was introduced into soybean (*Glycine max*) after self-pollinated by liquid method. One of the variation types (D_3) was selected and its protein and amino acids were compared with its parents. It was showed by the SDS-PAGE that most of the protein subunits in D_3 cotyledon were similar to that in soybean during different germination stages, while a subunit with molecular weight about 30000 Doldon was obviously came from peanut, yet the changes of β -subunits in D_3 during germination were different from that in soybean. The contents of Gly, Leu, His and Thr in D_3 were extremely higher than that in its parents, while the contents of Glu, Asp, Ala, Val, Met, and Trp were lower than their parents. The contents of Ser and Ile were the same as those in peanut. The results showed that introducing peanut's DNA into soybean did induce the difference in their offsprings.